

(Manuscrit reçu le 19 février 1988)

LES CRISTAUX INTRAKYSTIQUES
DES GRÉGARINES (APICOMPLEXA) PARASITES
DU SPATANGUE *ECHINOCARDIUM CORDATUM*
(ECHINODERMATA)

par

P. COULON (1), J. JEDWAB (2) et M. JANGOUX (1)

(1) Laboratoire de Biologie marine,

(2) Laboratoire de Géochimie

Université Libre de Bruxelles (CP 160)

av. F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles (Belgique)

RÉSUMÉ

Les gamétokystes matures des grégarines parasites de l'oursin *Echinocardium cordatum* renferment tous un amas de petits cristaux. Les analyses à la microsonde électronique et par diffraction des rayons-X montrent qu'il s'agit de cristaux d'acide urique. C'est la première fois que la présence d'acide urique est rapportée dans un phylum de protozoaires.

Mots-clés : acide urique, excrétion, protozoaires.

Intracystic crystals of gregarines (Apicomplexa) parasites
in spatangoid *Echinocardium cordatum* (Echinodermata)

SUMMARY

All ripe gametocysts of the gregarines that parasite the echinoid *Echinocardium cordatum* house a mass of small crystals. Electron microprobe and X-ray analysis show these crystals consist of uric acid. This is the first report of uric acid in a protozoan phylum.

Key-words : uric acid, excretory product, protozoans.

INTRODUCTION

Les grégarines parasites d'échinodermes affectent exclusivement les holothuries et les oursins irréguliers (JANGOUX, 1987). Quels que soient les sites de l'hôte où ces grégarines réalisent leur cycle, leurs sporokystes (gamétokystes matures renfermant des spores infestantes) aboutissent généralement dans le coelome général de l'échinoderme. On les trouve fréquemment enrobés dans des amas pigmentés appelés corps bruns (CHANGEUX, 1961; DE RIDDER et JANGOUX, 1984).

Une des particularités des grégarines de spatangues, lorsqu'on les compare à celles infestant les holothuries, est la présence constante dans les sporokystes des premières d'un amas cristallin. Visible par transparence, cet amas fut observé pour la première fois par GIARD (1876) qui l'utilise comme critère taxonomique pour

définir l'espèce *Lithocystis schneideri*, grégarine parasite du spatangue *Echinocardium cordatum*. Pour LEGER (1897) il s'agirait de cristaux d'oxalate de calcium, suggestion qu'il n'était d'aucune preuve. Depuis ces cristaux ont été signalés par plusieurs auteurs (PIXELL-GOODRICH, 1915; GRASSÉ, 1953; LEVINE, 1977), aucun ne s'étant toutefois attaché à en préciser la nature. Le présent travail a pour but de caractériser la nature chimique de ces cristaux grégariens et d'en envisager la signification.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Trente individus d'*Echinocardium cordatum* (PENNANT, 1777) ont été récoltés à marée basse à Wimereux (Pas de Calais, France) en mars 1987. Ramenés à Bruxelles, ils furent disséqués sous loupe binoculaire; les corps bruns recueillis furent dilacérés et les kystes qu'ils renfermaient prélevés.

Pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB), les kystes sont fixés 2 h à 4°C dans une solution 3 % de glutaraldéhyde en tampon cacodylate (0,1 M; pH 7,4), ils sont ensuite rincés dans le même tampon, postfixés 30 min dans une solution 0,1 % de tetroxyde d'osmium en tampon cacodylate (0,1 M; pH 7,4), rincés une nouvelle fois dans le tampon et déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant. Les kystes sont ensuite séchés par la méthode de passage au point critique en utilisant le CO₂ comme liquide de transition. Les kystes sont alors déchirés localement à l'aide d'une aiguille montée (mise en évidence des cristaux), métallisés à l'or et observés à l'aide d'un MEB ISI DS-300.

La composition chimique des cristaux a été analysée à l'aide d'une microsonde électronique de Castaing (Superprobe JEOL-733) couplée à un spectromètre à dispersion d'énergie (Tracorn-Northern TN-2000). Pour ce faire des frottis de kystes frais avaient été préalablement réalisés sur lames microscopiques.

Pour l'analyse par diffraction des rayons X, 50 sporokystes (conservés dans l'éthanol 70 %) ont été disséqués et leurs amas cristallins respectifs rassemblés et séchés à l'étuve (30°C, 12 h). La méthode utilisée est celle de PRIEN et FRONDEL (1947) qui utilise le rayonnement K α du cuivre ($\lambda = 1,5418$ Å) avec filtre de nickel. Les rayons X diffractés sont enregistrés au diffractomètre et sur film photographique (méthode de Debye-Scherrer). Les distances réticulaires (d) des cristaux de l'échantillon sont calculées par la formule de Bragg : $n\lambda = 2d \sin \theta$, où $n = 1$, $\lambda = 1,5418$ Å et θ est mesuré. Les résultats obtenus sont comparés aux données des fiches ASTM (American Society for Testing and Materials; fiches n^{os} 19-1996, 21-1959, 21-1960, 20-2000 et 20-2000A).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les *Echinocardium cordatum* de la région de Wimereux hébergent jusqu'à cinq espèces distinctes de grégariens appartenant aux genres *Lithocystis* et *Urospora* (COULON et JANGOUX, 1987). Tous les sporokystes examinés, soit plusieurs centaines au total et appartenant à au moins cinq espèces différentes, renferment un amas cristallin. Les amas s'observent aisément par transparence dans les kystes frais ou fixés (Pl. I, 1). Situé immédiatement sous la paroi kystique, l'amas cristallin affecte la forme d'une calotte. Chaque amas renferme plusieurs centaines de cristaux de taille et de forme variées : ils mesurent de 3 à 15 μm dans leur plus grande dimension et sont souvent en forme de prisme oblique à six faces (Pl. I, 2). Les cristaux sont maintenus solidaires grâce à des reliquats cytoplasmiques issus vraisemblablement du couple grégarien parental à l'origine du kyste.

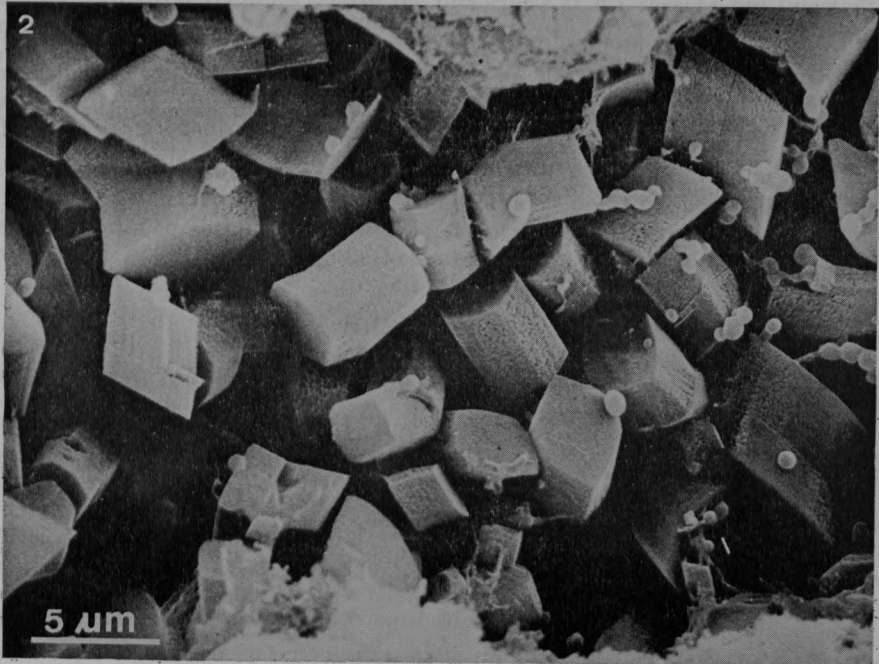
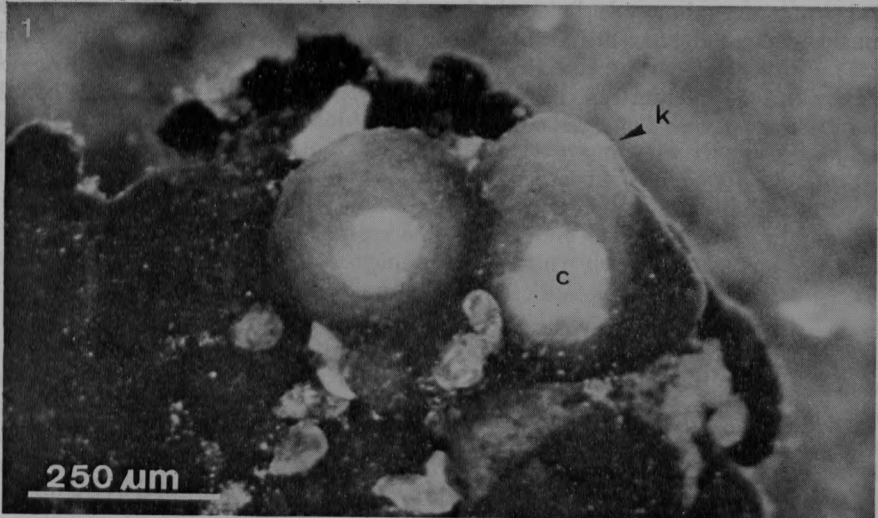


PLANCHE I

1 : Kystes grégariens dans un corps brun du coelome d'*Echinocardium cordatum* :
 c : amas cristallin, k : kyste ; 2 : Cristaux d'acide urique dans un kyste déchiré (micro-
 scope électronique à balayage).

L'analyse des cristaux à la microsonde de Castaing fournit un spectre typique de substance organique : la bosse de la radiation Compton se situe vers 1,6 KeV et aucun élément de nombre atomique supérieur à 10 n'est présent en abondance (Fig. 1). Ce résultat permet d'exclure tous les sels minéraux organiques en ce compris l'oxalate de calcium qui, selon LEGER (1897), formerait les cristaux intrakystiques de la grégarine *Lithocystis schneideri*.

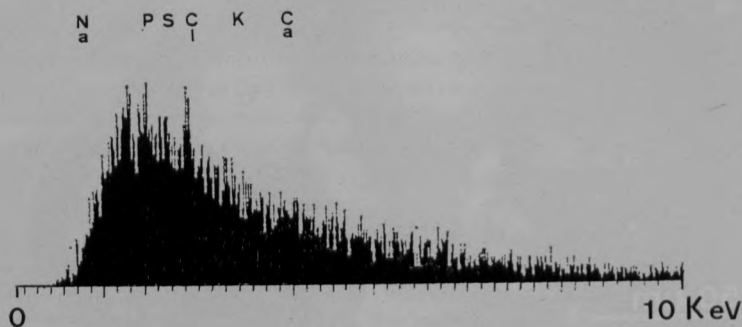


Fig. 1. — Spectre d'émission de rayons X produit par un cristal intrakystique.

Le diagramme obtenu au diffractomètre montre un seul pic de rayons X diffractés pour un angle 2θ égal à $27,9^\circ$, ce qui correspond à une distance réticulaire d de $3,20 \text{ \AA}$ (Fig. 2) (la même raie est visible sur film photographique). Une telle distance réticulaire caractérise, selon les fiches ASTM, l'acide urique dont les raies de diffraction les plus intenses sont comprises entre $3,08$ et $3,20 \text{ \AA}$ (l'analyse ne permet pas de préciser s'il s'agit d'acide urique hydraté ou non).

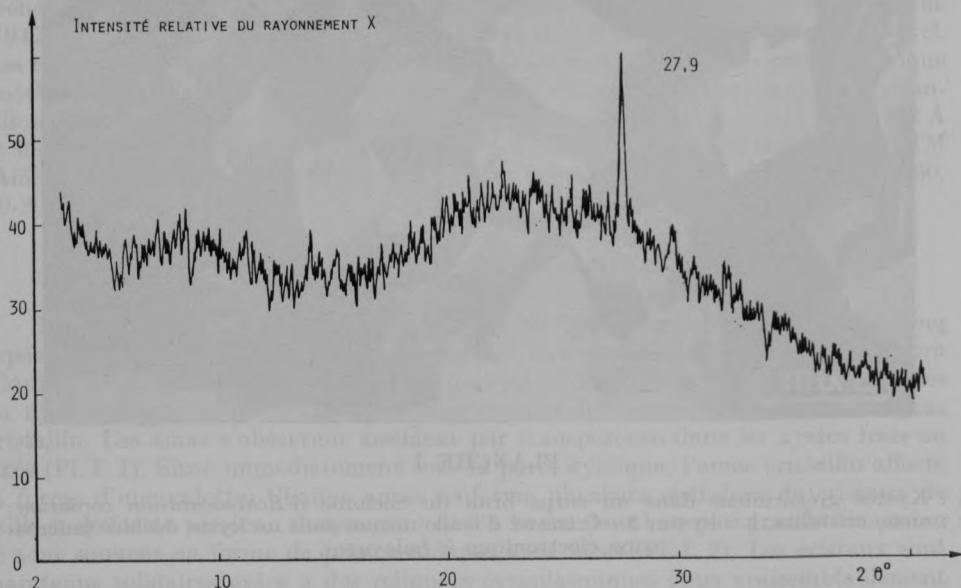


Fig. 2. — Spectre des rayons X diffractés par les cristaux intrakystiques.

Il est généralement admis que les protozoaires sont ammonotéliques (DE PUYTORAC *et al.*, 1987). Certains ciliés peuvent toutefois excréter de l'urée et/ou de l'hypoxanthine (VAN WAGTENDONK et SOLDI, 1970). En outre le protoplasme de quelques amibes carnivores (*e.g.*, *Amoeba proteus* et *Chaos chaos*) contient des inclusions cristallines que GRIFFIN (1961) et STOCKEM (1978) considèrent comme des formes de stockage de déchets azotés. MINCHIN (1917) rapporte la présence, fréquente selon lui, d'« insoluble excretion masses » dans le cytoplasme des protozoaires et plus particulièrement de certains sporozoaires (groupes non précisés); selon MINCHIN (*op. cit.*) ces déchets pourraient être expulsés par les cellules avant l'enkystement, soit persister dans le protoplasme pour être finalement abandonnés avec les reliquats cytoplasmiques issus de la gamétogénèse. La nature de ces inclusions cristallines et masses insolubles n'a toutefois jamais été précisée.

L'acide urique constitue un produit d'excrétion fréquemment rencontré chez les métazoaires; il n'avait jamais été identifié dans un phylum de protozoaires. Dans le cas particulier des *Lithocystis* et *Urospora* parasites de l'*Echinocardium cordatum*, les cristaux d'acide urique rencontrés résultent en toute hypothèse de l'activité métabolique intense dont le kyste jeune est le siège (gamétogénèse et sporogénèse). La capacité qu'ont ces grégarines d'excréter sous forme d'acide urique est très intrigante : exceptionnel au sein des protozoaires ce phénomène semble même ne concerner que les grégarines de spatangues. En effet, de tels amas cristallins n'ont jamais été rapportés dans les kystes de *Lithocystis* et d'*Urospora* qui infestent les holothuries (PIXELL-GOODRICH, 1925; CHANGEUX, 1961). Tout se passe comme si la production d'acide urique était davantage liée au type d'hôte infesté qu'à la grégarine elle-même. On sait que chez les spatangues, au contraire de ce qui a lieu chez les holothuries, les kystes grégariens peuvent séjourner plusieurs années dans le coelome de l'hôte (ils ne sont libérés et ne peuvent réinitier un nouveau cycle qu'à la mort de l'oursin; COULON et JANGOUX, 1987). Une explication possible est que l'excrétion d'acide urique, produit peu soluble et non toxique, répondrait avantageusement aux conditions particulières rencontrées par les grégarines de spatangue (stockage de très longue durée de déchets azotés dans un milieu confiné).

RÉFÉRENCES

- COULON, P. et M. JANGOUX (1987) — Gregarine species (Apicomplexa) parasitic in the burrowing echinoid *Echinocardium cordatum*: occurrence and host reaction. *Dis. aquat. Org.*, **2**, 135-145.
- CHANGEUX, J. P. (1961) — Contribution à l'étude des animaux associés aux holothurides. *Vie Milieu*, **10** (suppl.), 1-124.
- DE PUYTORAC, P., J. GRAIN et J. P. MIGNOT (1987) — *Précis de Protistologie*. Boubée, Paris, 581 pp.
- DE RIDDER, C. et M. JANGOUX (1984) — Intracoelomic parasitic Sporozoa in the burrowing spatangoid echinoid *Echinocardium cordatum*: coelomocyte reaction and formation of brown bodies. *Helgoländer Meeresunters.*, **37**, 225-231.
- GIARD, A. (1876) — Sur une nouvelle espèce de psorospermie (*Lithocystis schneideri*) parasite de l'*Echinocardium cordatum*. *C.R. hebdomadaire Acad. Sci. Paris*, **82**, 1208-1210.
- GRASSÉ, P. P. (1953) — Sporozoa, in : *Traité de Zoologie*, Tome 1, Fasc. 2, 545-797. P. P. GRASSÉ (éd.), Masson, Paris.
- GRIFFIN, J. L. (1961) — Identification of *Amoeba* crystals. II. Triuret in two crystal forms, *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 433-439.
- JANGOUX, M. (1987) — Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protists. *Dis. aquat. Org.*, **2**, 147-162.

- LEGER, L. (1897) — Contribution à la connaissance des sporozoaires parasites des échinodermes. Étude sur le *Lithocystis schneideri*. *Bull. scient. France Belgique*, **30**, 241-264.
- LEVINE, N. D. (1977) — Checklist of the species of the aseptate gregarine family Urosporidae. *Int. J. Parasitol.*, **7**, 101-108.
- MINCHIN, E. A. (1917) — *An Introduction to the Study of the Protozoa*. Edward Arnold, London, 520 pp.
- PIXELL-GOODRICH, H. (1915) — On the life-history of the Sporozoa of spatangoids, with observations on some allied forms. *Quart. J. microsc. Sci.*, **61**, 81-104.
- PIXELL-GOODRICH, H. (1925) — Observations on the gregarines of *Chirodota*. *Quart. J. microsc. Sci.*, **69**, 620-628.
- PRIEN, E. L. et C. FRONDEL (1947) — Studies in urolithiasis : I. The composition of urinary calculi. *J. Urol.*, **57**, 949-991.
- STOCKEM, W. (1978) — Fine structure of cytoplasmic crystals in *Amoeba proteus*. *Cytobiologie*, **17**, 301-306.
- VAN WAGTENDONK, W. J. et A. T. SOLDO (1970) — Nitrogen metabolism in Protozoa. In : J. W. CAMPBELL (ed.), *Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism*, Vol. 1, *The invertebrate* : 1-49. Academic Press, London and New York.